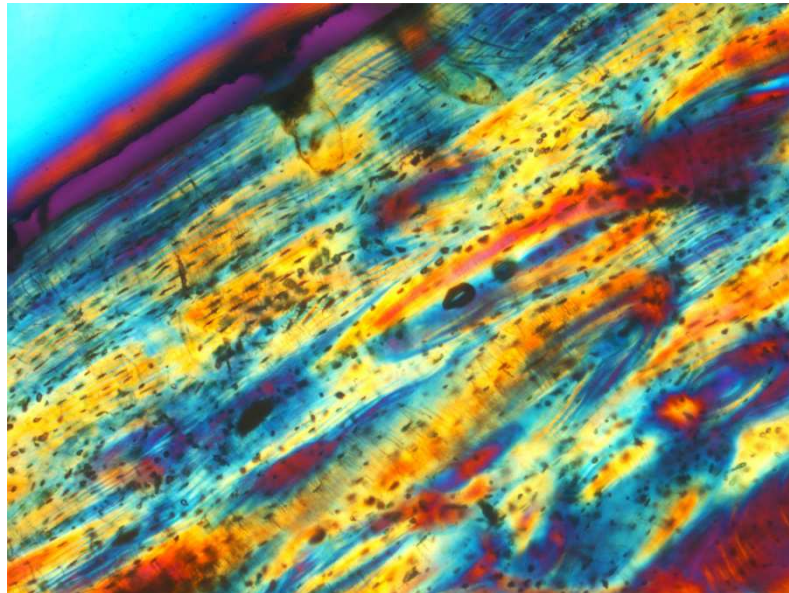


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

EL CONOCIMIENTO DE LAS POBLACIONES DEL
PASADO A TRAVÉS DE LOS RESTOS ÓSEOS:

ESTUDIO PALEOHISTOLÓGICO DE LOS HUESOS DEL CRÁNEO



PROYECTO FIN DE CARRERA

BIOLOGÍA EVOLUTIVA Y BIODIVERSIDAD

Orosia García Gil

Madrid, Septiembre 2012



FACULTAD DE
CIENCIAS



LABORATORIO
DE POBLACIONES
DEL PASADO

UAM
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Procesos tafonómicos en huesos arqueológicos	3
1.2 El hueso como componente biológico	4
1.3 Organización de la estructura ósea	6
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1 Muestra osteoarqueológica	9
3.2 Preparación de láminas delgadas	11
3.3 Dibujando el hueso: Sistemas de Información Geográfica aplicados a la Antropología física	12
4. RESULTADOS	13
4.1 Preservación de la muestra	13
4.2 Estudio histológico del hueso	14
4.3 Compartimentalización de los huesos	19
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES	26
7. AGRADECIMIENTOS	27
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

NOTA

Foto de portada: Imagen obtenida mediante microscopía de luz polarizada combinada con una cuña de cuarzo (20x aumentos). Detalle de la tabla externa del hueso frontal en la que se observa hueso laminar y canales que contactan con el exterior.

1. INTRODUCCIÓN

Los huesos son elementos del sistema esquelético formados por un tejido conjuntivo especializado, el tejido óseo. Este tejido está compuesto por células y matriz extracelular, que presenta, como característica diferenciadora frente a otros tejidos conjuntivos, la matriz extracelular mineralizada (Ross y Pawlina, 2007). Esta particularidad confiere al sistema esquelético la rigidez y elasticidad adecuadas para poder sostener el peso del cuerpo y, en determinadas regiones, proteger estructuras y órganos para que no sean dañados (Bayliss *et al.*, 2011). Por otro lado, el tejido óseo actúa como lugar de depósito y almacén de iones, como calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}), implicándolo en la regulación homeostática de funciones fisiológicas de nuestro cuerpo (p.e., la calcemia) (Ross y Pawlina, 2007).

El hueso es objeto de estudio de muchas disciplinas científicas: Antropología, Paleontología, Zoología, Medicina, etc. Por ejemplo, el médico necesita descubrir tratamientos que eviten que el tejido óseo degenere y así mejorar la calidad de vida en personas de avanzada edad. Los investigadores en ciencias de los materiales necesitan fabricar estructuras más resistentes o materiales más biocompatibles que además no agredan químicamente al medio natural. Para ello imitan las propiedades físico-químicas de los tejidos orgánicos, como el hueso, en los materiales que se utilizan en la vida cotidiana. ¿Qué mejor forma existe de soportar el peso en movimiento que con un cilindro hueco? Pero desde nuestro punto de vista, es decir, desde la Antropología física o la Biología, lo más extraordinario de los huesos es que son un vestigio único de los organismos del pasado, tanto del remoto (Paleontología) como del cercano (Antropología, Zoología). Por lo tanto, y teniendo en cuenta el contexto osteoarqueológico en el que se desarrolla este trabajo, el hueso puede ser más que un tejido estructural a imitar, constituyendo un registro de las vidas pasadas (Turner-Walker *et al.*, 2002).

Debido a su especial naturaleza y al múltiple interés que este peculiar tejido orgánico despierta, se puede estudiar el hueso osteoarqueológico de diferentes formas: analizando cómo ha resistido el paso del tiempo, mediante la observación de las alteraciones que ha experimentado desde el momento de la muerte del organismo (transformaciones tafonómicas); analizando su estructura dentro del organismo, para conocer la variación entre diferentes huesos o a lo largo de la vida; o simplemente estudiando cómo imitar su organización estructural.

1.1 Procesos tafonómicos en huesos arqueológicos

Cuando recuperamos un hueso de un yacimiento arqueológico, la Tafonomía, encargada del estudio de la fosilización (Lyman, 1994), permite valorar y comprender cómo han actuado diferentes factores en la preservación de los restos de un organismo desde su muerte hasta su enterramiento definitivo (fase bioestratigráfica, donde un cadáver puede pasar por eventos tales como una exposición ambiental prolongada, desarticulación, transporte, etc.), así como a las alteraciones físico-químicas tras el enterramiento (fase diagenética), tanto a escala macroscópica como microscópica (Cambra-Moo, 2006).

Los huesos están formados por células (10%) inmersas en una matriz (90%) de naturaleza orgánica e inorgánica. La parte orgánica está constituida en un 90% por fibras de colágeno y el restante 10% por otras proteínas entre las que se encuentran proteoglicanos, osteoprolinas, osteonectinas y osteocalcinas (Little *et al.*, 2011). La porción mineral la componen cristales de fosfato de calcio carbonatado, conocido como hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ y en menor medida fosfato cálcico $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ (Carden y Morris, 2000). A su vez, en los espacios no mineralizados o porosos del hueso se encuentran “tejidos orgánicos” (capilares, nervios, etc.), constituidos por diversas biomoléculas (p.e., proteínas de la sangre, lípidos celulares, ADN). Todos estos componentes son susceptibles de experimentar deterioro químico debido a que los restos no están en equilibrio termodinámico con el entorno. Por ello, los procesos acontecidos son cruciales para la preservación de los huesos, así como de los elementos y estructuras que los constituyen (Collins *et al.*, 2002).

Para valorar el estado de preservación en el que se encuentran los restos recuperados se pueden estudiar las modificaciones producidas a diferentes niveles. Por un lado, atendiendo a la parte inorgánica de la matriz, la estructura geométrica de la hidroxiapatita se mantiene inalterada pero pueden haber aparecido sustituciones isomórficas (Stout, 1978); es decir, cambios en la composición química por procesos de recristalización o mediante sustitución de grupos OH^- y PO_4^{3-} por otros como Cl^- , F^- , y CO_3^{2-} , transformándose con ello en fluorapatita carbonatada (Pfretzschner, 2004). Una vez ocurrida la alteración del componente mineral la porción orgánica del hueso será susceptible de experimentar deterioro. Debido a que las tasas a las que se produce el deterioro de biomoléculas son lentas durante el enterramiento, los restos recuperados podrían proporcionar una información molecular importante (Collins *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, pueden tener lugar alteraciones de origen microbiano; con ello se

genera desmineralización localizada del hueso apareciendo pequeños agujeros o cavidades en la microestructura del tejido óseo (Hanson y Cain, 2007).

Por otra parte, además de afectar a los componentes del hueso, las alteraciones diagenéticas pueden producir modificaciones en la estructura histológica. En este contexto, Garland (1989, citado en Hanson y Cain, 2007) describió tres alteraciones que denominó como destrucciones generalizadas, inclusiones o infiltraciones. Cuando se produce la desintegración de osteonas generando un hueso de apariencia amorfa, el proceso recibe el nombre de destrucción generalizada. Las inclusiones hacen referencia a la presencia de material del exterior, tanto de origen biológico como mineral, localizado dentro de los espacios porosos del tejido óseo. Por último, las infiltraciones implican la tinción de una sección cortical del hueso, debido a la penetración de sustancias químicas u otros elementos (Hanson y Cain, 2007).

Otros cambios diagenéticos que pueden observarse con frecuencia en los huesos son las fisuras. Se clasifican según su tamaño en dos tipos: las fisuras extensas, que abarcan grandes partes del hueso, y las microfisuras, a escala de osteonas (Jans *et al.*, 2002).

1.2 El hueso como componente biológico

El hueso es un tejido orgánico que puede ser analizado a nivel microscópico desde diferentes perspectivas. Comenzado desde su origen, la mayoría de los huesos derivan de la capa embrionaria del mesodermo. Sin embargo, en el cráneo parece estar bien documentado que algunos huesos se originan a partir de la cresta neural, como ocurre con el esplacnocráneo o cara; mientras que en los huesos que conforman el neurocráneo la contribución del mesodermo o de la cresta neurales es más controvertida y no se ha esclarecido aún el origen embrionario concreto de cada hueso (Couly *et al.*, 1993; Gilbert, 2003; Morriss-Kay, 2001). El proceso de formación del hueso (osteogénesis) implica el reemplazo de tejido mesenquimal por tejido óseo, y puede producirse según dos modelos diferentes (Gilbert, 2003). Por un lado, en la osificación endocondral la formación de tejido óseo tiene lugar de manera indirecta; el tejido mesenquimal se diferencia en un molde de cartílago, que será reemplazo posteriormente por tejido óseo, como ocurre en los huesos largos. Por otra parte, cuando las células mesenquimáticas se diferencian directamente en osteoblastos (células formadoras de tejido óseo), la osificación se denomina intramembranosa, como sucede en los huesos del cráneo (Ross y Pawlina, 2007). No está clara la razón por la cual unos huesos se preconfiguran en cartílago, otros directamente en tejido óseo o porqué otros se generan a partir de un origen

mixto, como es el caso de la mandíbula o la clavícula (Scheuer y Black, 2000). Se ha sugerido que la osificación intramembranosa podría formar tejido óseo durante el desarrollo embrionario de manera más rápida en localizaciones donde es necesaria una osificación directa, sin estadio previo de cartílago (Opperman, 2000), quizá para proveer protección como ocurriría con el cerebro (Gilbert, 2003). Algunos autores apuntan que el origen podría considerarse irrelevante ya que el resultado final es el mismo (Enlow, 1968), mientras que otros autores relacionan los huesos intramembranosos con un posible origen dérmico. Filogenéticamente, estos huesos dérmicos se originarían a partir de las armaduras óseas tegumentarias de los peces primitivos, que se hunden y ponen en contacto con el resto de huesos de origen endocondral para formar el cráneo (Kardong, 2007).

Los huesos se modifican a lo largo de la vida experimentando cambios en su tamaño, forma y organización histológica, mediante procesos de modelado (en los que los patrones de deposición y reabsorción del hueso se suceden en superficies complementarias) y de remodelación (producto de la reabsorción y deposición en una región de tejido óseo preexistente) (Currey, 2002). De esta forma, los huesos endocondrales sólo presentarían esta composición “endocondral” en su origen más temprano, siendo reemplazando progresivamente por tejido óseo de osificación intramembranosa hasta quedar confinado en pequeñas regiones aisladas (Enlow, 1968). Por esta razón, en un individuo adulto existe poca reminiscencia del tejido óseo juvenil.

Una vez introducidos el origen, la formación y las modificaciones que se producen en los huesos, falta estudiar qué células forman parte del tejido óseo. En alusión a su actividad, primeramente podemos encontrar los osteoblastos; derivados de las células osteoprogenitoras mesenquimáticas, se encargan de sintetizar y mineralizar la matriz, así como de la producción de colágeno y de otros componentes orgánicos. Estas células comenzarán a denominarse osteocitos al quedar rodeadas de matriz mineralizada (Bayliss *et al.*, 2011), confinados individualmente en las llamadas lagunas (*lacunae*) y conectados con los osteocitos colindantes por prolongaciones citoplasmáticas, que atraviesan la matriz mineral mediante canalículos (Ross y Pawlina, 2007). Los osteocitos son los encargados de mantener el equilibrio en el hueso formado, controlando las concentraciones extracelulares de calcio y fosfato. El tercer tipo de células del tejido óseo son los osteoclastos, encargados de reabsorber el hueso preexistente. Son células libres, de origen hematopoyético, que circulan por el torrente sanguíneo y que contienen lisosomas y fosfatasa ácida (Parfitt *et al.*, 1987). La reabsorción del tejido óseo tiene lugar en unas depresiones, llamadas espacios de reabsorción

o de Howship, y está estrechamente relacionada con la formación de osteonas secundarias (Little *et al.*, 2011).

1.3 Organización de la estructura ósea

Macroscópicamente, en una sección de hueso pueden distinguirse dos formas estructurales, denominadas hueso cortical (o compacto) y hueso esponjoso (o trabecular). El hueso cortical presenta una densidad media de entre 1,6 y 2,4 g/cm³ (Hillier y Bell, 2007). Se pueden diferenciar en él tres zonas: la zona subperióstica o exterior, lugar en el que se localizan las inserciones musculares; la región media y la endóstica o interior. Por otra parte, el hueso esponjoso está formado por espículas óseas, llamadas trabéculas (Hillier y Bell, 2007). Se localiza mayoritariamente en los extremos de los huesos largos (epífisis). En el cráneo el hueso esponjoso recibe el nombre de diploe y se sitúa entre dos láminas corticales, denominadas tabla externa y tabla interna (Schultz, 2001).

Microscópicamente, tanto el hueso cortical como el esponjoso presentan, de manera generalizada, dos tipos de tejido óseo: laminar o no laminar. Durante el desarrollo embrionario, o en procesos de reparación de tejidos (Hillier y Bell, 2007), se forma un tejido óseo de apariencia desorganizado, compuesto por fibras de colágeno orientadas al azar que rodean progresivamente a los vasos sanguíneos y nervios colindantes (Figura 1 A a–b). Este tejido se denomina “entretejido”

(*woven bone*) y se deposita muy rápidamente (> 4 µm/día). En contraste, el hueso laminar (*lamellar bone*) se deposita a un ritmo más lento (< 1 µm/día), estableciendo una estructura altamente organizada (Currey, 2002). El hueso laminar consiste en capas paralelas de fibras de colágeno entre las que se disponen, de manera estructurada, los cristales de hidroxapatita. Este tejido laminar conforma estructuras fácilmente reconocibles, como el

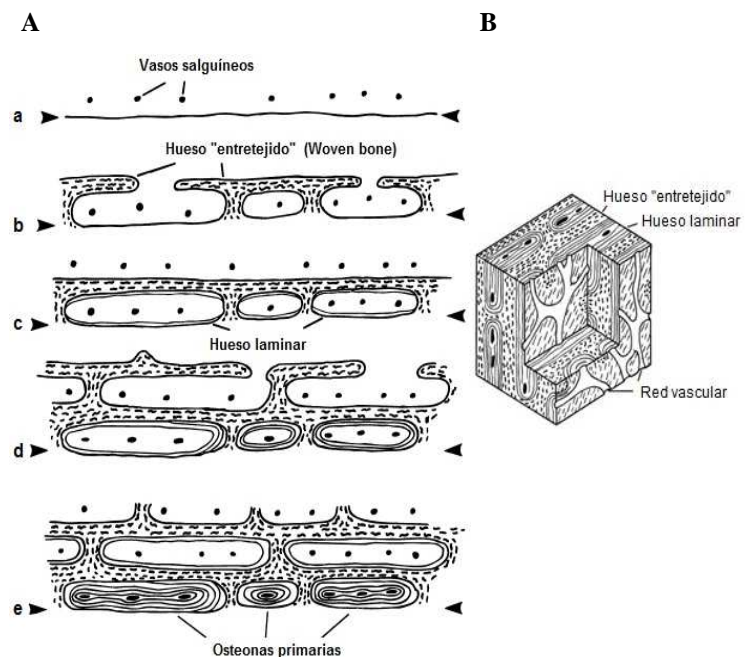


Figura 1. A) Formación del hueso fibrolaminar. **B)** Estructura en tres dimensiones del hueso fibrolaminar (imágenes extraídas y modificadas de Currey, 2002).

hueso laminar circunferencial externo en la región subperióstica (*outer circumferential lamellae*) o el hueso endóstico (*endosteal bone*) localizable en la región interna de la cortical o en la superficie que rodea a las trabéculas del hueso esponjoso (Enlow, 1968). Tras el tejido inmaduro entretejido comienza a depositarse un tejido de apariencia laminar denominado hueso fibrolaminar (*fibrolamellar bone*; Figuras 1A c-e y 1B), a una tasa de deposición intermedia entre la del hueso entretejido y la del hueso laminar. El tejido fibrolaminar se genera por adición en la región subperióstica (cortical externa). Al formarse la matriz ósea los vasos sanguíneos, que rodean y nutren al hueso desde el exterior, van quedando inmersos entre las capas de tejido. Alrededor de estos vasos atrapados se depositan anillos concéntricos de hueso laminar, generando las estructuras conocidas como osteonas primarias (Figura 1A e) (Currey, 2002; Hillier y Bell, 2007). La aparición de estos tejidos representa el modelado, que determinan el crecimiento óseo (Enlow, 1968).

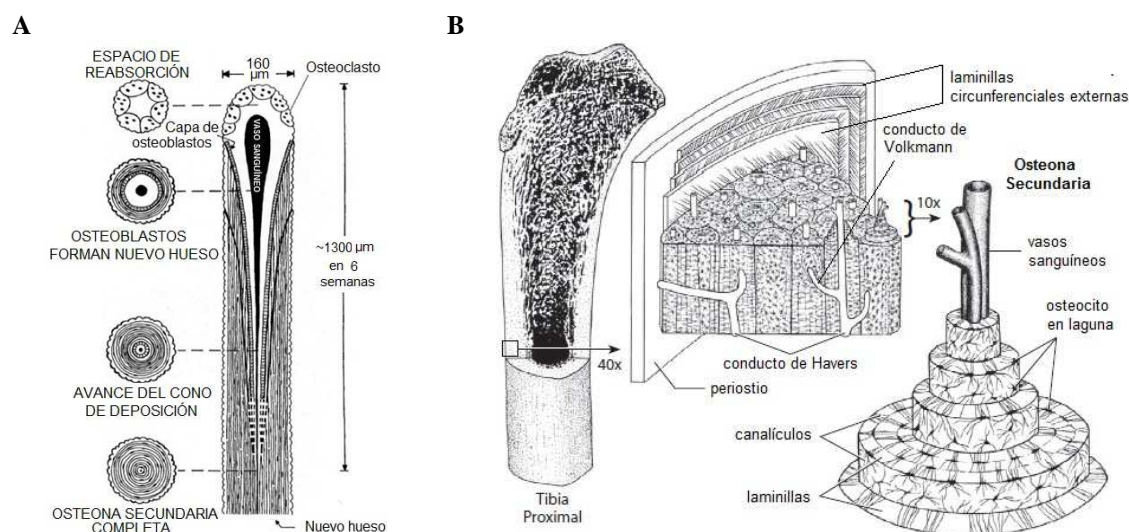


Figura 2. A) Modelo propuesto para el proceso de remodelación y formación de una osteona secundaria. Imagen extraída y modificada de Enlow y Hans (1996). **B)** Sección de hueso largo y modelo en tres dimensiones propuesto para explicar la estructura microscópica del tejido secundario. Imagen extraída y modificada de White y Folkens (2005).

A partir de este momento, el tejido óseo puede presentar remodelación (Figura 2A). Los osteoclastos se encargan de disolver el hueso y los osteoblastos de depositar tejido nuevo en respuesta a demandas homeostáticas, a traumas físicos o requerimientos mecánicos (Bayliss *et al.*, 2011). Las nuevas estructuras generadas se denominan osteonas secundarias (o sistemas de Havers), constituyendo el hueso secundario o hueso haversiano (Figura 2B). A nivel microscópico, las láminas de tejido se organizan concéntricamente alrededor de un canal (conducto de Havers), que contiene vasos sanguíneos y nervios. Estas osteonas secundarias se mantienen interconectadas mediante unas estructuras perpendiculares denominadas canales de Volkmann. La principal diferencia entre estas osteonas y las osteonas primarias es la

presencia de líneas de cemento que delimitan a las osteonas secundarias, formadas como resultado de eventos de reabsorción y deposición de hueso (Hillier y Bell, 2007).

En la mayoría de estudios que abordan la histología ósea se emplean huesos largos (Hillier y Bell, 2007; Locke, 2004), siendo relativamente escasos aquellos basados en huesos planos como los del cráneo. Este sesgo en las investigaciones genera que los estudios histológicos del cráneo presenten como inconveniente carecer de evidencias suficientes con las que comparar sus propios resultados. Las fuerzas mecánicas, así como otros factores que actúan sobre el modelado de los huesos del cráneo, no son las mismas que las que operan sobre los huesos largos, configurando unas estructuras histológicas determinadas para cada caso (Hillier y Bell, 2007). Bartsiokas (2002) señala que esta carencia de datos se hace notablemente patente en estudios histológicos de homínidos. Esta situación podría ser consecuencia de la importancia anatómica atribuida históricamente al cráneo, que podría seguir condicionado a los encargados de la conservación de los restos a mostrarse más reticentes a proporcionar muestras de cráneos frente a otros huesos.

El cráneo es la estructura más compleja del esqueleto (White y Folkens, 2005). Se considera que está constituido por dos unidades, el esplanocráneo y el neurocráneo; este último estaría conformado por la calvaria, también denominada bóveda craneal, y por la base del cráneo. En los estudios centrados en el desarrollo del cráneo la mayoría de la literatura fija su atención en la mandíbula y la maxila (Enlow, 1968; Enlow y Hans, 1996) y en la base del cráneo (Duterloo y Enlow, 1970). La calvaria está conformada enteramente por huesos de osificación intramembranosa, originados entre el mesénquima dérmico y las meninges que rodean el cerebro (Morriss-Kay y Wilkie, 2005), y son relativamente pocos los estudios que se centran en su desarrollo (Opperman, 2000). La componen cinco huesos: el parietal y el frontal (ambos huesos pares, este último se fusiona tempranamente en la infancia), la parte escamosa del occipital (hueso impar, denominado en otros mamíferos como interparietal), las alas mayores del esfenoides y la sección escamosa del temporal (ambos huesos pares) (Morriss-Kay y Wilkie, 2005).

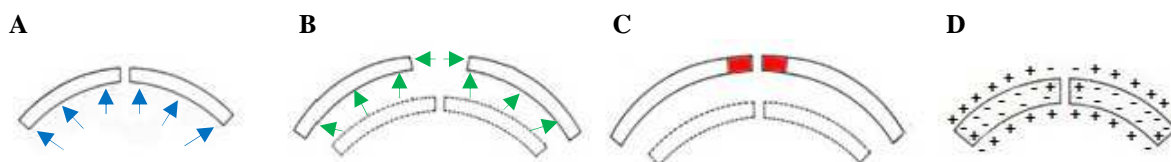


Figura 3. Esquema del crecimiento y desplazamiento de los huesos del cráneo. **A)** Desplazamiento de cráneo por el crecimiento del encéfalo. **B)** Movimiento del cráneo hacia fuera y separación de los huesos. **C)** Crecimiento en las suturas. **D)** Esquema del modelado, el símbolo positivo (+) representa áreas de deposición y el negativo (-) áreas de reabsorción. Imágenes extraídas y modificadas de Enlow y Hans (1996).

El cráneo, al estar formado por una serie de huesos separados, presenta una coordinación entre el crecimiento del mismo y la expansión del cerebro en desarrollo (Morriss-Kay y Wilkie, 2005) mediante el movimiento pasivo de los huesos (Figura 3A y 3B) (Enlow y Hans, 1996). Las suturas son los tejidos fibrosos que mantienen unidos los huesos del cráneo (Opperman, 2000) y representan el lugar donde se produce el crecimiento óseo en los márgenes adyacentes de los huesos (Morriss-Kay y Wilkie, 2005) (Figura 3C). La fusión ósea (u obliteración completa) no ocurre normalmente hasta una edad avanzada en el cráneo humano, a excepción de la sutura metópica (interfrontal), que suele fusionarse entre los 18 meses (Morriss-Kay y Wilkie, 2005) y los 5 años de edad (Opperman, 2000).

El hueso es un tejido modulado ontogenética y filogenéticamente, y sensible por tanto, a diferentes factores fisiológicos, de edad o de tamaño. Si se examina la estructura histológica de diferentes especies, a diferentes edades, en un mismo individuo en diferentes huesos o diferentes regiones del mismo hueso, se encontrarán una amplia variedad de diseños estructurales (Enlow, 1968).

2. OBJETIVOS

- Desarrollar una metodología apropiada para la preparación de láminas delgadas de hueso de osificación intramembranosa, para su posterior observación mediante microscopía óptica de transmisión y de luz polarizada.
- Examinar las transformaciones tafonómicas microscópicas presentes en dichos huesos, para conocer el estado de preservación de la colección de estudio.
- Estudiar las características histológicas del tejido de diferentes huesos del neurocráneo de un mismo individuo, para determinar cuáles son las semejanzas y los caracteres diferenciales entre todos ellos.
- Analizar la distribución espacial de los tejidos y cavidades presentes en la estructura ósea mediante el procesamiento de imágenes con un programa de análisis SIG, para estudiar la compartimentalización que presenta el tejido en su interior.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Muestra osteoarqueológica

El material utilizado para la realización de las láminas delgadas ha sido escogido de la colección osteoarqueológica recuperada en Almansa (Albacete). Esta colección procede de un

osario datado entre los siglos XIII y XVIII, relacionado con la Iglesia de Santa María de la Soledad (Aguilar, 2011). Al trabajar con un enterramiento secundario colectivo, los restos aparecen en su mayoría desarticulados y no es posible determinar qué unidades esqueléticas pertenecen a cada uno de los individuos recuperados.

Se seleccionó un cráneo adulto (considerando la calcificación y completa erupción del tercer molar; Ubelaker, 1978) en base a estándares de normalidad (Buikstra y Ubelaker, 1994), desechando determinados caracteres no métricos (p.e., presencia de sutura metópica, huesos suturales, obliteración completa de suturas). Se descartaron cráneos en mal estado de preservación o con notables alteraciones tafonómicas. Además, se realizó un análisis paleopatológico para valorar que el cráneo escogido no presentara patologías reconocibles. El cráneo fue lavado con agua para limpiar los restos de tierra e impurezas adheridas y se dejó secar a temperatura ambiente, sin ser expuesto a ninguna fuente de calor. Seguidamente se realizó la medición de los parámetros craneométricos (Buikstra y Ubelaker, 1994), para recolectar la máxima información posible.

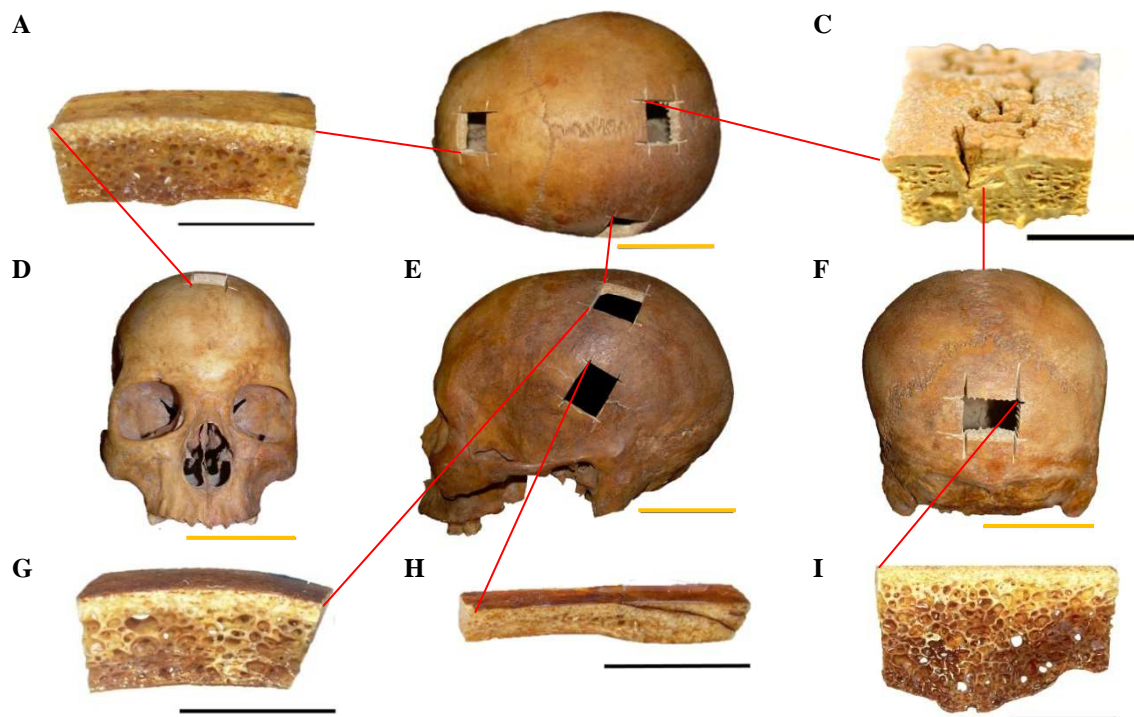


Figura 4. Normas del cráneo y fragmentos obtenidos. **A)** Fragmento del frontal. **B)** Norma superior del cráneo. **C)** Fragmento de la sutura sagital. **D)** Norma anterior del cráneo. **E)** Norma lateral izquierda. **F)** Norma posterior. **G)** Fragmento del parietal. **H)** fragmento de la sutura temporoparietal. **I)** Fragmento del occipital. Las líneas de escala representan: 1 cm las de color negro, 5 cm las de color amarillo. Las líneas rojas señalan la localización del fragmento en el cráneo.

El procedimiento para la preparación de las láminas delgadas se fundamentó en los propuestos anteriormente por Frost (1958) y Ubelaker (1974), ajustando el método a las

particularidades de los huesos del cráneo. Con el objeto de englobar el mayor número posible de huesos de origen intramembranoso, se midieron los arcos de la superficie ectocraneal de los huesos parietal, frontal y occipital, así como de la sutura temporoparietal y la sagital, eligiendo la región izquierda para los huesos y suturas pares, y se calcularon métricamente puntos de la sección media de estas cinco áreas.

Las fragmentos de hueso se extrajeron con una minitaladradora “Multiherramienta” (Practyl, MD130CN), utilizando discos de 2 cm de diámetro y 0.6 mm de espesor. En las localizaciones donde los huesos presentaban un elevado espesor (p.e., hueso occipital y sutura sagital) fue necesaria la utilización adicional de una broca de 2 mm de diámetro. Como resultado se obtuvieron cinco fragmentos de huesos, de 20x15 mm de ancho (Figura 4).

3.2 Preparación de láminas delgadas

Los fragmentos obtenidos se embutieron en resina (EpoFix Resin) mezclada con endurecedor (EpoFix Hardener) y se introdujeron en una bomba de vacío 10 minutos para eliminar las posibles burbujas de aire y favorecer la correcta intrusión de la resina en los poros del hueso. Transcurridas 24 horas para el endurecimiento de la resina, de cada sección de hueso embutido se realizaron tres cortes, utilizando una microcortadora (Buehler ISOMET. Lake Bluff. Illinois, USA). Los cortes se hicieron siguiendo la misma dirección en todos los fragmentos, es decir, cortes en el extremo anterior, paralelos al plano coronal del cráneo y perpendiculares a la superficie; como excepción, en el fragmento del hueso parietal, se realizaron tres cortes adicionales en su lado medial, paralelos al plano de la sutura sagital. Con ello, se obtuvieron un total de 18 cortes, de 1 mm de espesor cada uno. A continuación, los cortes fueron pulidos por una cara, utilizando una pulidora manual (Metaserv 3000. *Variable speedgrinder*. Buehler, Düsseldorf, Alemania) con dos lijas de carburo de silicio de tamaño de grano de 1200 y 4000. Posteriormente, los cortes fueron fijados en un portaobjetos, utilizando un adhesivo de montaje para superficies biológicas (DEPEX *Mounting*). Mediante la pulidora manual se rebajaron los cortes hasta obtener láminas delgadas de un espesor inferior a 100 μ m, siendo este el espesor máximo para la observación en el microscopio óptico. En el proceso de pulido se utilizaron, de manera seriada, lijas de carburo de silicio de tamaño de grano 320, 1200, 2500 y 4000, a una velocidad media de 150 revoluciones por minuto. El tiempo de pulido de cada lámina delgada, así como el uso de las diferentes lijas fue variable, dependiendo de las características del corte y de la evolución observada durante el pulido mismo.

De las 18 láminas delgadas obtenidas se eligieron 6 para su observación en el microscopio óptico de transmisión (Olympus BX61, Hamburgo, Alemania). Se fotografiaron los cortes en su totalidad, mediante la cámara incorporada al microscopio (Olympus DP70, Hamburgo, Alemania). Posteriormente, las fotografías fueron montadas, utilizando el editor de imágenes Photoshop (Photoshop CS5, Adobe Systems, San José, USA), obteniendo seis fotomontajes, que representaban la sección histológica completa de cada corte. También se observaron las secciones histológicas al microscopio de luz polarizada, combinado con una cuña de cuarzo para observar los posibles efectos de la distribución diferencial de los cristales de hidroxiapatita. Al estudiar un material cristalino que presenta el fenómeno físico de la birrefringencia (doble refracción), cuando un haz de luz polarizada penetra en la muestra se genera una diferencia de fase (retraso) entre ambas ondas (MacKenzie y Adams, 1997). En la imagen obtenida los colores no se corresponden con los del espectro visible, sino con la secuencia de siete colores del disco de Newton (Schultz, 2001). Los colores observados varían en función de la orientación de las fibras de colágeno, y con ello de la disposición de los cristales respecto al plano de polarización de la luz, permitiendo identificar los tipos de tejido óseo y estructuras del mismo (Bromage *et al.*, 2003; Mackenzie y Adams, 1997).

3.3 Dibujando el hueso: Sistemas de Información Geográfica aplicados a la Antropología física

Con el objetivo de conocer la variación de la estructura histológica de los huesos del cráneo desde una perspectiva morfológica, los fotomontajes obtenidos en el estudio microscópico se procesaron utilizando un programa de análisis de Sistemas de Información Geográfica (SIG) (ArGIS 9.3, Esri, Redlands, USA), mapeando la localización tanto de tejidos mineralizados como de tejidos no mineralizados. Mediante este programa se pueden dibujar minuciosamente las estructuras que se deseen y definirse su variación cuantitativa, a la vez que se puede atribuir a cada objeto las características cualitativas que sean necesarias, en nuestro caso el tipo de tejido. La utilización de programas SIG permite además conocer la localización espacial exacta de cada estructura dibujada en relación a las demás, aspecto que sumado a lo anterior, no es posible obtener con otro tipo de programas de dibujo o análisis de imágenes (CAD, Photoshop, Image J). Para este estudio se definió y dibujó el área ocupada por el tejido mineralizado; la porosidad, aquellas áreas que no sobrepasen los 0,001 mm²; y los espacios denominados “otras cavidades no mineralizas” (OCN), que engloban los espacios de reabsorción del hueso o los canales vasculares de gran tamaño (Cambra-Moo *et al.*, 2012).

4. RESULTADOS

Para facilitar la explicación y comprensión de los diferentes resultados obtenidos, se propone una aproximación a los mismos desde tres puntos de vista: 1) Estado de preservación de las muestras; 2) Estudio histológico del hueso; 3) Compartimentalización de los huesos.

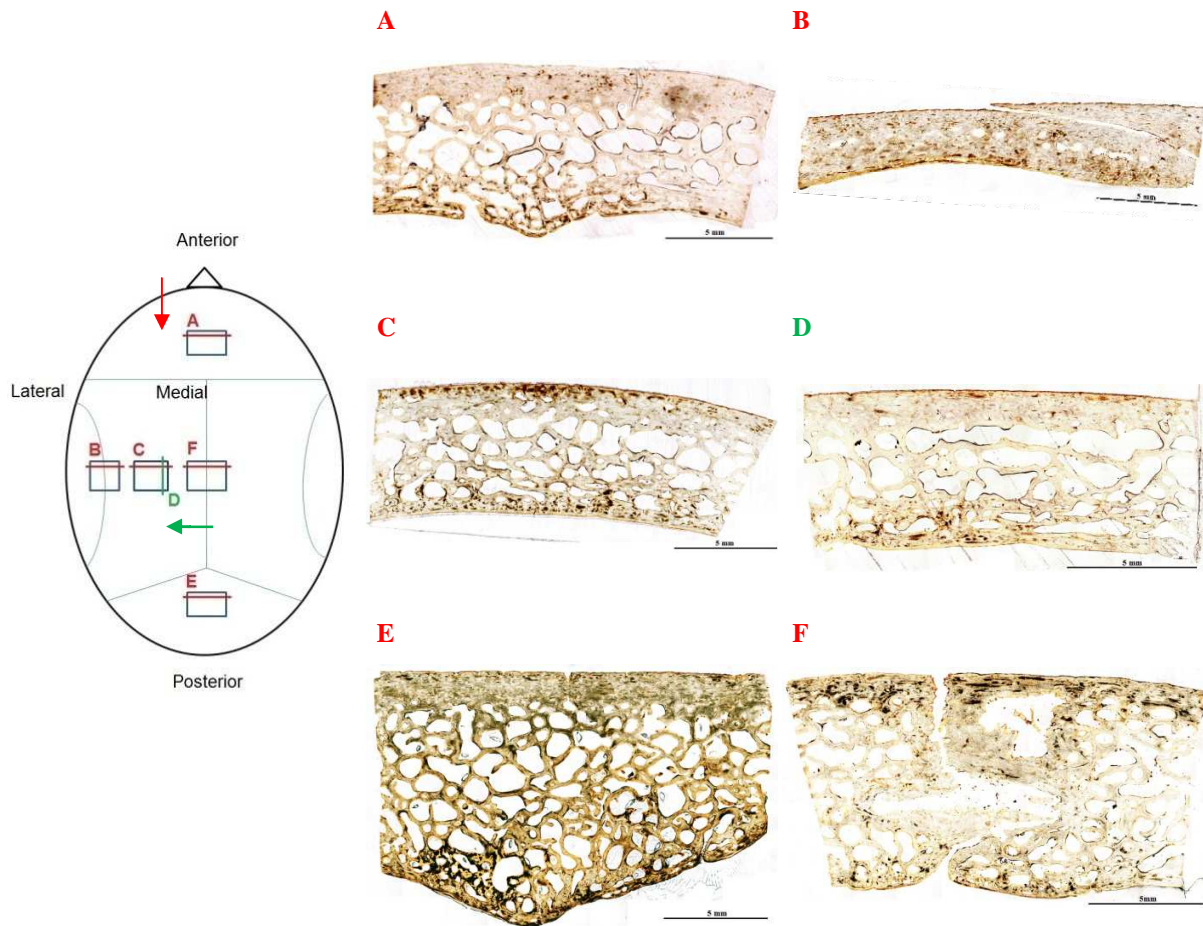


Figura 5. El esquema a la izquierda representa las regiones de las que se han obtenido las muestras. Las flechas indican el sentido de observación de los cortes; flecha roja sentido anteroposterior, flecha verde sentido lateromedial. **Figuras A-F.** Fotomontajes de las láminas delgadas observadas y fotografiadas con el microscopio óptico. **A)** Frontal. **B)** Sutura Temporoparietal. **C)** Parietal cortado en dirección coronal. **D)** Parietal cortado en dirección sagital. **E)** Occipital. **F)** Sutura Sagital. Las líneas de escala representan 5 mm.

4.1 Preservación de las muestras

A simple vista, el estado de preservación del cráneo era bueno ya que se trataba de un requisito inicial en la elección de la pieza para realizar el estudio. Una vez realizadas las láminas delgadas, se procedió a observar su organización histológica realizando

conjuntamente un estudio del estado de preservación. De manera puntual, se pueden observar en los cortes zonas de apariencia oscura y opaca que dificultan la correcta identificación de las estructuras histológicas correspondientes a estas localizaciones. Además de las manchas oscuras, en uno de los cortes, en concreto en la lámina delgada del parietal cortado en dirección sagital, se pueden observar unas cavidades que penetran en la tabla interna (ver más adelante Figura 7D, flechas negras). La apariencia, el diámetro y la localización de estas perforaciones son diferentes a las características observadas en otros canales que contactan con el exterior descritos en la tabla externa, que se explicarán en el apartado correspondiente al estudio histológico del hueso. Por estas razones se podría pensar que las perforaciones en la superficie interna son producto de alteraciones tafonómicas, originadas posiblemente por microorganismos, en lugar de tratarse de canales vasculares.

4.2 Estudio histológico del hueso

Para comprender cómo se organizan histológicamente los huesos del cráneo, se integró la información obtenida de las observaciones realizadas con el microscopio óptico y el microscopio de luz polarizada. Para ayudar en la comprensión del texto y de las imágenes, en la Tabla 1 se pueden consultar los términos referentes a las estructuras histológicas más utilizados y sus correspondientes abreviaturas. De manera general, se ha podido observar que los cortes de los huesos frontal, parietal y occipital (Figuras 5A, 5C, 5D y 5E) parecen presentar una distribución similar de tejidos y estructuras en determinados aspectos, tanto en las tablas corticales como en la diploe, si bien cada corte presenta unas peculiaridades propias. Sin embargo, en los cortes correspondientes a las suturas (Figuras 5B y 5F) la morfología y la organización de los tejidos aparece muy modificada, debido a que son zonas donde dos huesos se encuentran enfrentados y los procesos de modelado y remodelación actúan en ellos de manera conjunta.

Tabla 1. Abreviaturas de los términos usados en el texto y figuras.			
CE	Canal que contacta con el exterior	HFL	Hueso fibrolaminar
CH	Canal horizontal	HL	Hueso laminar
D	Diploe	OP	Osteona primaria
ER	Espacio de reabsorción	OS	Osteona secundaria
HE	Hueso endóstico	WB	Hueso entretejido (<i>woven bone</i>)

En el hueso frontal se observa HL en la región subperióstica de ambas tablas. En la tabla externa, como queda reflejado en la Figura 6C, este tejido parece estar formado por hasta 5 capas paralelas y se observan unos canales en la superficie ectocraneal que atraviesan la laminación. En adelante, estas estructuras se denominarán como “canales que contactan con el exterior” (CE). Por otro lado, el HL en la tabla interna parece estar constituido por una sola capa de tejido (Figura 6D). En el resto de la cortical de ambas tablas se observa HFL, con OP muy dispersas y OS que son más numerosas en regiones próximas a la diploe, indicando que el hueso se encuentra remodelado en estas regiones. En la tabla externa en este tejido fibrolaminar aparecen unas estructuras horizontales que llaman la atención al ser observadas con el microscopio de luz polarizada. Estas estructuras podrían ser canales vasculares vistos en sección longitudinal u oblicua, que se llamarán en adelante “canales horizontales” (CH, Figura 6B). En la tabla interna en el HFL se observan ER (Figura 6D) de diferentes tamaños, señalando que el hueso se encontraba en proceso de remodelado. En las trabéculas de la diploe se aprecia un tejido laminar, el HE, con OS aisladas en las zonas de intersección de varias trabéculas (Figura 6A).

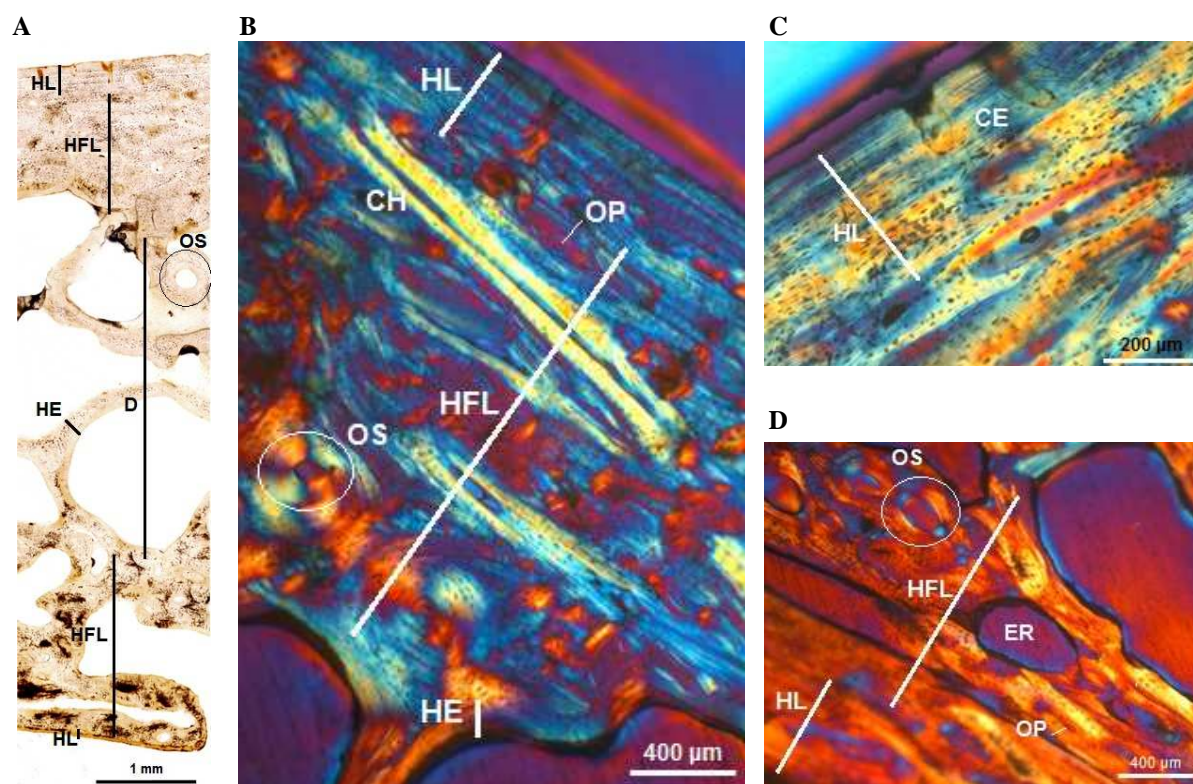


Figura 6. Cortes histológicos del hueso frontal observados con el microscopio óptico (A) y con el microscopio de luz polarizada (B-D). **A)** Sección histológica del hueso frontal. **B)** Tabla externa. **C)** Detalle del hueso laminar de la tabla externa. **D)** Tabla interna; la superficie endocraneal se localiza hacia la esquina inferior izquierda.

Como se menciona en el apartado de metodología, para el hueso parietal se realizaron cortes en dos direcciones diferentes (coronal y sagital) para intentar comprobar si el sentido del corte influye en la interpretación de las estructuras observadas. En la tabla externa de ambos cortes se encuentra un único tipo de tejido, el HFL (Figura 7A). Se observan numerosos canales dispuestos de forma seriada que atraviesan este tejido y que contactan con el exterior, así como con OS (Figuras 7B y 7C, flecha blanca). Por otra parte, la tabla interna de ambos cortes parece estar organizada con dos tipos diferentes de tejido (Figuras 7D y 7E): en la región más periférica aparece una capa de HL, que no se había observado en la tabla externa de este hueso; y en el resto de la cortical hasta la diploe se distingue HFL, con ER. Las osteonas aparecen distribuidas por toda la cortical de ambas tablas: las OP se observan muy dispersas y las OS aparecen en mayor número en regiones cercanas a la diploe, tal como se observaba en el hueso frontal. La única diferencia remarcable entre los dos cortes, es la presencia de unas perforaciones que atraviesan la superficie de la tabla interna del parietal en sentido lateromedial (Figura 7D, flecha negra), que ya han sido descritas en el apartado de preservación de la muestra.

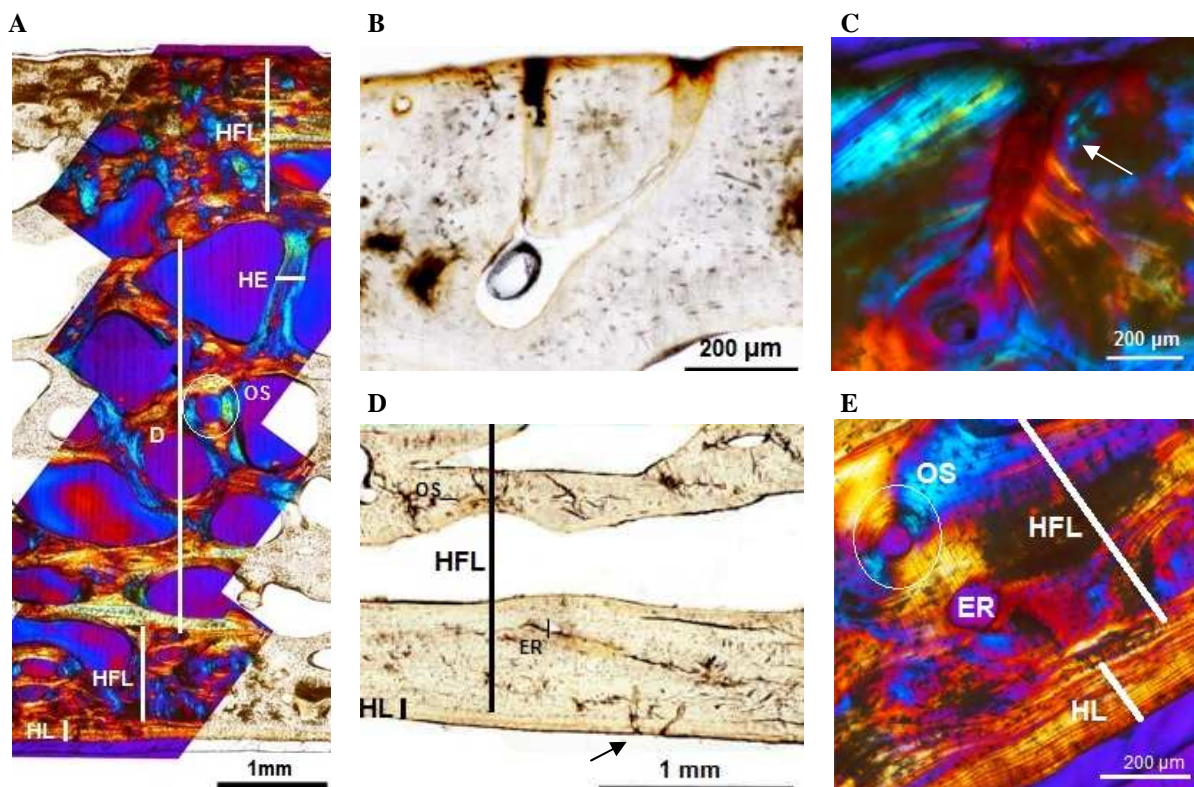


Figura 7. Cortes histológicos del hueso parietal observados con el microscopio óptico (A, B, D) y con el microscopio de luz polarizada (A, C, E). **A)** Sección histológica del parietal cortado en dirección coronal, con superposición de imágenes de ambos tipos de microscopía. **B)** OS con dos CE en la tabla externa del parietal cortado en dirección sagital. **C)** CE en la tabla externa del parietal cortado en dirección coronal, flecha blanca. **D)** Tabla interna del parietal cortado en dirección sagital. La flecha negra señala las perforaciones producida por posibles microorganismos. **E)** Tabla interna del parietal cortado en dirección coronal.

Atendiendo a la similitud observada, se puede plantear que el sentido en el que se hicieron los cortes para realizar las láminas delgadas parece no haber influido en la interpretación de las estructuras observadas en el hueso parietal.

La sección de hueso occipital parece tener un espesor mayor que los huesos frontal y parietal, esto puede deberse a que en esta región del occipital se localizan unos relieves característicos en la superficie endocraneal, como son la protuberancia occipital interna y la transición al denominado surco occipital, relacionados con la localización del seno sagital, una de las vías sanguíneas más importantes de irrigación del cerebro (White y Folkens, 2005). En ambas tablas se puede observar HFL (Figura 8A), sin la presencia de capas de HL como se ha observado en el hueso

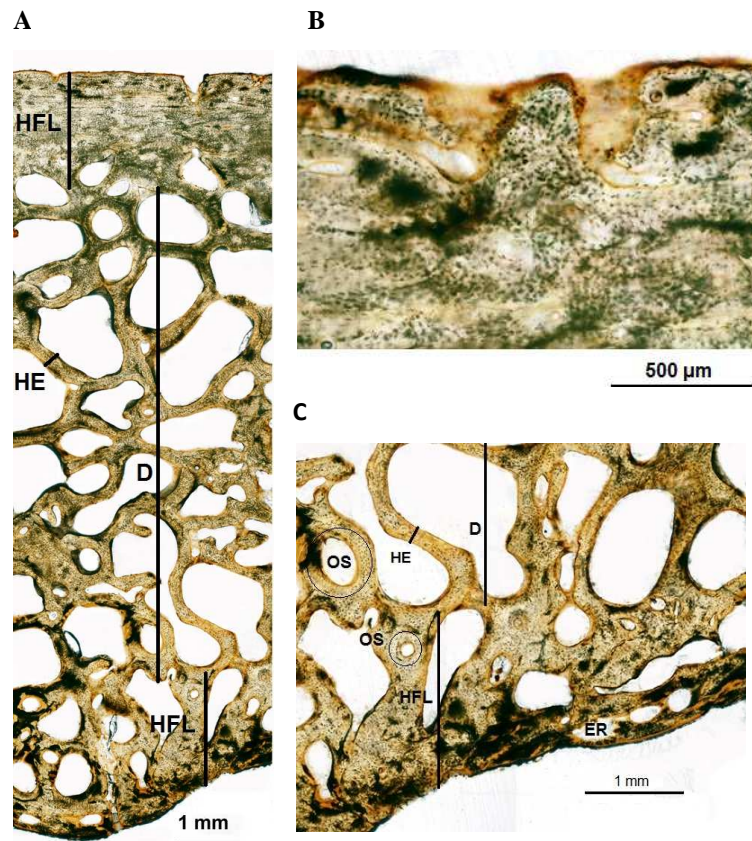


Figura 8. Cortes histológicos del hueso occipital, observados con el microscopio óptico. **A)** Sección hisológica completa. **B)** Detalle de la tabla externa con CE. **C)** Tabla interna y diploe.

frontal o en la tabla interna del parietal. En la tabla externa se pueden identificar CE (Figura 8B), que parecen presentar un diámetro mucho mayor que el observado en los CE de las otras localizaciones estudiadas. En relación a la tabla interna, a simple vista no se distingue un límite claro entre la región cortical y la diploe. La tabla interna parece encontrarse reducida mientras que la diploe parece extendida hasta regiones muy próximas a la superficie endocraneal. Sin embargo, microscópicamente se observa que la tabla interna no está tan reducida, pudiéndose establecer un límite relativo entre la cortical y la diploe mediante la distinción del HFL, observando los ER e identificando las trabéculas de la diploe con HE (Figura 8C).

El estudio histológico de las suturas permite interpretar la variación de tejidos cuando dos huesos se contraponen. El corte de la sutura sagital muestra el área de contacto entre el parietal derecho e izquierdo. La tipología de tejidos que aparecen se corresponde con los observados en las secciones de hueso parietal anteriormente descritas, si bien la organización cambia drásticamente en la zona de la sutura. También aparecen los CE (Figura 9A) y además se localizan por primera vez en la lámina interna en una zona próxima a la sutura sagital (Figura 9C, flechas rojas). Los extremos de los huesos que conforman la sutura muestran un aspecto muy sinuoso y quebrado. Se observan dos tipos de organizaciones histológicas que parecen alternarse, en regiones de cada frente, a lo largo de toda la extensión de la sutura. De esta forma encontramos que, mientras en un parietal aparecen áreas altamente remodeladas, con numerosas osteonas secundarias, en el frente del parietal opuesto el tejido que se observa tiene un aspecto desorganizado, que podría corresponderse con el tejido primario entretejido (Figuras 9B). Si bien las suturas se consideran como puntos de osificación intramembranosa (Opperman, 2000), la presencia WB podría representar una coordinación en la formación de hueso en uno de los frentes, mientras en el contrapuesto se produce la remodelación.

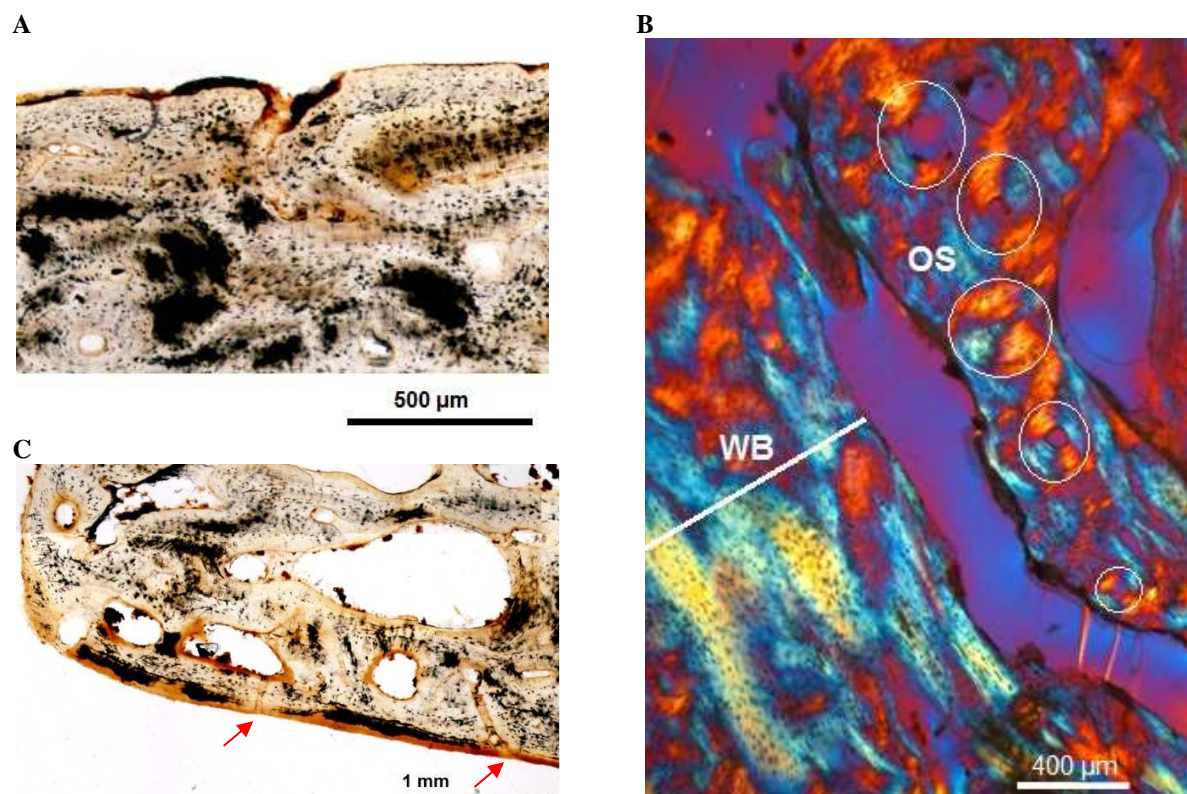


Figura 9. Cortes histológicos de los huesos parietales en la sutura sagital. **A)** Tabla externa con CE. **B)** Sutura sagital con WB y tejido remodelado con OS (círculos blancos). **C)** Tabla interna con CE (flechas rojas).

Los huesos parietal y temporal forman la escama del temporal, una sutura de borde biselado con el temporal dispuesto por encima del parietal. Debido al drástico cambio morfológico que sufren los huesos en esta localización, la sección histológica de los mismos refleja un aspecto muy diferente a la organización observada en los demás cortes, como puede apreciarse en la Figura 10. La diploe aparece en ambos huesos muy reducida o inapreciable, observándose una sola línea de cavidades rodeadas de HFL.

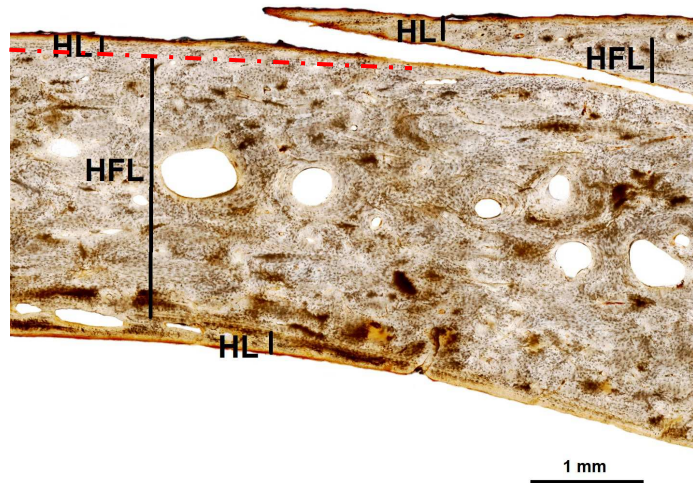


Figura 10. Corte histológico de los huesos que forman la sutura temporoparietal. El hueso temporal se encuentra dispuesto por encima del parietal. La línea roja discontinua representa el HL en la tabla externa del parietal.

El hueso parietal presenta una capa de HL en la tabla externa, que no se observaba en otros cortes relativos al hueso parietal. Esta capa laminar desaparece justo en la zona de superposición con el hueso temporal (Figura 10, línea roja discontinua). A su vez, en la tabla interna también aparece una capa de HL y ER cerca de la superficie. El resto de la sección parece estar formada por los tejidos descritos anteriormente: HFL con OP y OS.

En el hueso temporal se puede observar HL en la tabla externa, con presencia de OS. Por debajo se distingue HFL. En esta sección de hueso no es posible delimitar con precisión qué regiones concretas abarcan la tabla externa y la tabla interna, ya que no se observa diploe.

4.3 Compartimentalización de los huesos

A simple vista, los cortes parecen presentar diferentes espesores, si bien todos ellos partían de una anchura común, establecida en 20 mm. A partir de las imágenes SIG se obtuvo el área total de cada corte de hueso; de esta forma, el área correspondiente para el frontal es de 122 mm², para en parietal 113,07 mm² y un área notablemente mayor (199,41 mm²) corresponde al occipital. Como ya se ha explicado anteriormente, el grosor del hueso occipital parece estar directamente relacionado con la región de la que se ha obtenido, que presenta unos relieves característicos en la superficie endocraneal. Analizando las proporciones que corresponden al área de tejido mineralizado, frente al de las otras cavidades no mineralizadas (OCN) y la porosidad, se observa como los tres huesos (frontal, parietal y occipital) parecen

mostrar unos resultados muy similares en estas proporciones. Como se puede apreciar en la Figura 11, el porcentaje mineral oscila entre valores del 58,29% en el occipital y 62,81% en el frontal. Para las OCN el porcentaje varía entre un 36,89% en el hueso frontal y un 41,50% en el occipital. A su vez, los tres huesos presentan un porcentaje de porosidad relativamente bajo, comprendido entre un 0,25% en el parietal y 0,35% en el frontal. La porosidad está representada en color negro en la Figura 11, pero debido a la baja proporción obtenida y al representar áreas menores de $0,001 \text{ mm}^2$, solo se distingue aumentando considerablemente el tamaño de las imágenes.

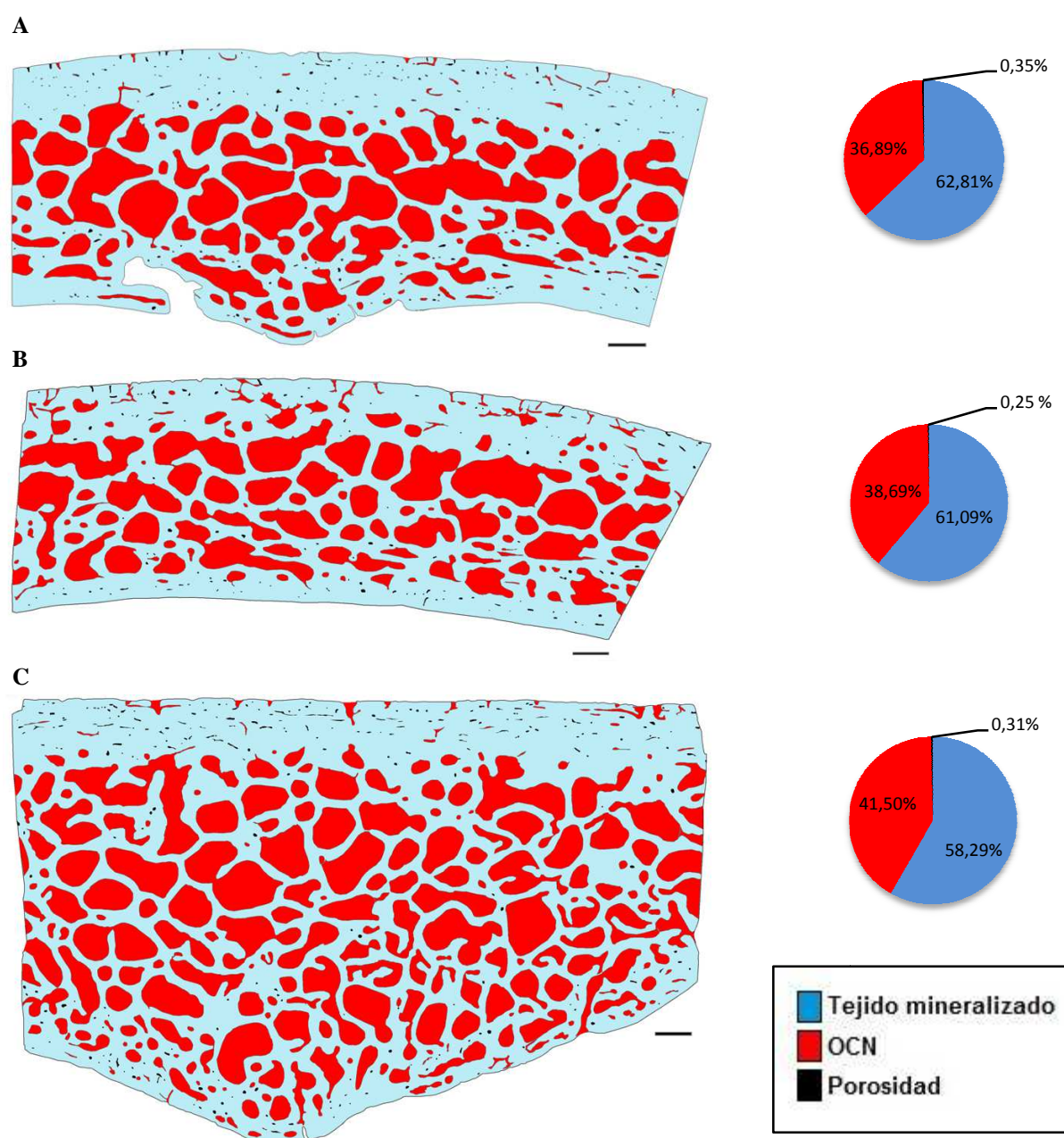


Figura 11. Estudio de la compartimentalización de los huesos del cráneo. **A)** Frontal. **B)** Parietal. **C)** Occipital. Las líneas de escala representan 1 mm.

Relacionando las imágenes SIG con la histología observada en el microscopio, se puede establecer que las OCN estarían representando: los ER en la tabla interna, los espacios de la diploe y los canales vasculares de la tabla externa, que incluirían a los CH y los CE. El bajo porcentaje obtenido para la porosidad representaría a las osteonas ya formadas, ya que las osteonas secundarias que están en proceso de formación, como vimos en la Figura 2A, tienen un diámetro mayor y se consideran OCN.

Al analizar los porcentajes de los huesos que conforman las suturas obtenemos valores totalmente alejados de las proporciones observadas en los tres huesos anteriores. Los huesos que conforman la sutura temporoparietal comprenden un área de $65,24 \text{ mm}^2$, y en su caso, el porcentaje de tejido mineralizado asciende a un 94,45%. Esto parecen indicar que la compartimentación de los huesos en esta sutura se ve modificada en gran medida, como ya se veía reflejado en el estudio histológico, donde la diploe se observaba muy reducida o desaparecida, y por tanto no contribuye al porcentaje de OCN. La otra sutura estudiada, la sutura sagital, también muestra unos porcentajes diferentes, si bien no tan acusados como en la otra sutura. La mineralización asciende al 66,35%, frente al 33,42% de otras cavidades no mineralizadas y un 0,27% de porosidad. Parece evidente que las suturas son regiones donde los huesos que las conforman presentan variaciones en su organización, y en concreto la escama del temporal parece ser una región del cráneo muy diferente a todos los niveles: anatómico, histológico y de compartimentalización.

A partir de las imágenes SIG es posible realizar un rápido conteo de los canales que contactan con el exterior para cada sección de hueso. De esta forma en el hueso frontal se observan 16 CE en los 20 mm de anchura de la lámina delgada (1 canal cada 1,25 mm), en el parietal se encuentran 20 perforaciones (1 canal cada 1 mm) y en el hueso occipital se pueden contar 14 canales (1 canal cada 1,43 mm). Así mismo, se puede apreciar que el diámetro que presentan los canales en el occipital es notoriamente más ancho, quizás compensando la disminución del número de canales respecto a otros huesos con el aumentando del diámetros de los mismos.

5. DISCUSIÓN

La aplicación de la metodología para la realización de láminas delgadas a partir de huesos del cráneo ha dado buenos resultados, si bien hay que considerar algunos inconvenientes en varios pasos del procedimiento. Independientemente de la metodología

utilizada, la realización de los cortes implica usar una técnica invasiva (Rühli *et al.*, 2007) y por tanto, es esencial mantener la integridad de las muestras durante el procesamiento (corte y pulido), para el posterior estudio de la microestructura del hueso (Paine, 2007). Por ello, en este estudio se han evitado procedimientos químicos (necesarios por ejemplo para la decalcificación del hueso) o físicos (como el sometimiento del hueso a temperaturas elevadas) que puedan producir cualquier tipo de alteración en el material. Al embutir las muestras en resina antes de realizar las láminas delgadas se evitan posibles modificaciones, tales como microfracturas, que pueden llevar a interpretaciones erróneas (Schultz, 2001). En las láminas delgadas obtenidas se han observado algunas burbujas, que pueden haberse producido durante el pegado o pueden deberse a la resina utilizada. En este trabajo, para asegurar la correcta intrusión de la resina en la muestra, y con ello intentar evitar la aparición de burbujas, los fragmentos inmersos en la resina se introdujeron en una cámara de vacío. Aun con ello, se pueden apreciar algunas burbujas en las láminas delgadas, pero en ningún caso han dificultado la observación de las estructuras histológicas.

Sin embargo, es en la fase de pulido cuando surgen la mayoría de los inconvenientes. Las láminas delgadas pueden abombarse, desprenderse el corte de hueso de la superficie de montaje o incluso romperse, dependiendo de la presión ejercida, de la velocidad y del tamaño de grano de las lijas. Para ello se recomienda controlar el progreso del pulido examinando la evolución de la lámina delgada y ajustar los tiempos de exposición a las diferentes lijas (de Boer *et al.*, 2011). Se ha comprobado que las zonas oscuras que se aprecian en los cortes no desaparecen al prolongar el tiempo de pulido. En el estudio realizado por de Boer *et al.* (2011) se expone que este fenómeno es frecuente en zonas trabeculares densas. Estas áreas oscuras podrían ser restos de materia orgánica, tanto colágeno de la matriz orgánica del hueso, como restos de otros tejidos orgánicos (nervios, capilares), así como proteínas de la sangre, lípidos celulares o moléculas de ADN (Collins *et al.*, 2002). También pueden deberse éstas a una alteración tafonómica, como las infiltraciones, que generan tinciones de la cortical por sustancias químicas u otros elementos provenientes del suelo en el que estuvieron depositados los restos óseos (Hanson y Cain, 2007).

Las estructuras histológicas observadas en los huesos del cráneo parecen corresponderse con los tejidos óseos descritos en huesos adultos, si bien la aparición y distribución de los tipos de tejido no parece ser constante en todas las láminas delgadas observadas. Uno de los resultados más destacables del presente trabajo es la frecuencia de aparición del tejido denominado hueso laminar. Siempre que se ha observado este tejido ha

aparecido en la región más periférica del hueso, tanto en la superficie ectocraneal como en la endocraneal. Este tejido laminar ha sido observado en un gran número de mamíferos, reptiles y anfibios, animales que hibernan o experimentan cambios estacionales relacionados con la dependencia de alimento (Hillier y Bell, 2007); sin embargo, no se han podido determinar las causas que determinan su distribución relativa y su aparición (Martin *et al.*, 1998). Bartsiokas (2002) sugiere que las capas de hueso laminar podrían ser un indicativo de la tasa de crecimiento del hueso. Este autor observó hueso laminar en el parietal de un *Homo sapiens* anatómicamente moderno, de 130.000 años de antigüedad, y consideró que las capas de tejido representaban líneas de crecimiento. Siguiendo un planteamiento similar, otros autores han comparado este tejido con los anillos de crecimiento de la madera (Enlow, 1968). En nuestro estudio, el hueso laminar no se observa distribuido de manera uniforme en los diferentes huesos del cráneo, apreciándose incluso diferencias en una misma tabla cortical, como parece ocurrir en el hueso parietal observado en diferentes cortes. Para este caso en concreto, en la superficie ectocraneal situada entre las localizaciones de las que se extrajeron las secciones de hueso parietal, es decir, entre la sutura temporoparietal y la región media del hueso parietal, se pueden encontrar dos líneas tenues y curvas denominadas *crotafites*. Estas líneas representan la inferior el lugar de inserción del músculo temporal y la superior el lugar de inserción de la aponeurosis de dicho músculo (Campillo y Subirà, 2004). Para posteriores estudios sería muy interesante seguir analizando diferentes regiones del hueso parietal para intentar establecer el límite donde aparece hueso laminar y comprobar, por ejemplo, si las inserciones musculares pueden tener alguna relación con la aparición de este tejido.

Otro resultado considerablemente llamativo ha sido la aparición de los “canales que contactan con el exterior”, observados en la tabla externa de todos los cortes. En otros estudios se señala la entrada de vasos sanguíneos o de venas diplóicas hacia el interior del hueso (Rühli *et al.*, 2007), como ocurre con las venas emisarias, que atraviesan el cráneo y comunican la región meníngea con la región subepidérmica (Falk, 1990), pero su aparición es meramente puntual y no se corresponde con las morfologías de los canales observados en la tabla externa de este estudio. En referencia a caracteres o morfologías anómalas en la tabla externa, Schultz (2001) presenta una serie de grados de una patología en la superficie ectocraneal denominada “hiperostosis porótica”, asociada a anemias crónicas. Esta patología, que suele encontrarse en cráneos de subadultos, se caracteriza por el crecimiento de la diploe y la reducción del grosor de la tabla externa, produciendo una porosidad anómala al quedar expuesta la diploe hacia el exterior. De acuerdo a nuestras observaciones, la “porosidad” que

se aprecia en los cortes y que ha sido considerada como canales, no parece ser el resultado de quedar expuesta la diploe, como ocurre en la patología descrita con anterioridad. A su vez, tampoco se ha observado una aparente reducción de la tabla externa, sino que ésta presenta un mayor grosor respecto a la tabla interna, siendo una característica general en los huesos del cráneo (Rühli *et al.*, 2007). Los canales observados, que se corresponderían con la porosidad normal del hueso, podrían ser canales vasculares que contactan con el exterior del cráneo, que junto con los canales de Havers y los canales horizontales, formarían parte de un entramado vascular en la tabla externa, de morfologías muy variadas, observados en este estudio en secciones de diferentes orientaciones (transversal, longitudinal, oblicua). Para los huesos largos está establecido que los canales de Havers tienen una orientación paralela al eje longitudinal del hueso y los canales de Volkmann aparecerían perpendicularmente, conectando osteonas (Hillier y Bell, 2007); sin embargo, no podemos aplicar directamente estas definiciones a los huesos del cráneo, ya que debido a su morfología plana no tienen un eje predominante. Según nuestras observaciones, los canales de Havers discurrirían paralelos a la superficie y los canales que contactan con el exterior deberían corresponderse con canales de Volkmann, pero que en lugar de conectar dos osteonas, comunican las osteonas con el exterior. Bartsiakos (2002) describe entre sus resultados una osteona con tres canales de Havers, localizada en la lámina externa de un hueso parietal, que remarca como inusual y no descrita previamente en vertebrados. La denomina como osteona “multicanal”. Señala que esta osteona puede representar el punto donde una pequeña vena diplóica se ramifica en venas más pequeñas. Según esta definición algunos de los canales observados que contactan con el exterior podrían ser osteonas multicanales, que entran o salen del cráneo, y forman parte de una variada y compleja red vascular en la tabla externa.

Llegado a este punto, no podemos olvidar que el cráneo se encuentra rodeando al encéfalo. El cerebro es extremadamente activo metabólicamente y genera un exceso de calor. A su vez, es particularmente sensible a temperaturas anormalmente elevadas (Falk, 1990). Las arterias que llegan al cerebro generalmente se encuentran a menor temperatura que las áreas del cerebro por las que circulan, tomando calor del cerebro de tal manera que las venas que salen presentan una temperatura mayor que las arterias aferentes. Falk (1990) hipotetiza que en el interior del cerebro la temperatura es menor que en la corteza, generando un gradiente térmico. De esta forma, la región externa será más susceptible de sufrir daños si se produce un aumento de la temperatura arterial. Esta autora propone que la red de venas emisarias actuarían como un “radiador”, encargándose de enfriar el cerebro humano a través de la

regulación de la circulación. Brace (1990) señala a su vez que el sistema venoso-arterial supraorbitario actuaría como otro componente en la disipación de calor, según la teoría del “radiador humano,” considerando la gran presencia de glándulas sudoríparas y la ausencia de pelo en la frente. Aunque hay que considerar la presencia de los canales que contactan con el exterior (CE) en la tabla externa con cautela, podrían estar relacionados con la hipótesis del radiador de enfriamiento del cerebro, proporcionando una red de vascularización mayor, localizada y dirigida a aumentar la comunicación con la región subepidérmica.

El conjunto de cortes de los huesos, sin considerar las muestras con sutura, presentan unos porcentajes de componente mineral y de los espacios no mineralizados tan similares que, parecen indicar que los huesos frontal, parietal y occipital siguen un patrón estructural común. Hay que considerar en este punto, que se han estudiado huesos que derivan, posiblemente, de diferentes linajes embrionarios (Morris-Kay, 2001); que el hueso frontal ha debido de experimentar un considerable proceso de remodelado, debido a la obliteración de la sutura metópica en la infancia (Opperman, 2000); además de ser huesos con grosores, relieves y estructuras específicas, como por ejemplo la protuberancia occipital interna, el surco occipital o las localizaciones musculares en la superficie ectocraneal (Campillo y Subirà, 2004). Con todo ello, los porcentajes obtenidos podrían ser el reflejo de una coordinación en los procesos de modelado y de remodelación de los huesos, que podrían explicar la diferente frecuencia de aparición de hueso laminar. Según los resultados de un estudio realizado por Cuijpers (2006) en huesos largos arqueológicos de humanos, caballos y ganado vacuno, pueden encontrarse diferencias en las estructuras observadas entre diferentes huesos largos de un solo esqueleto, entre regiones de un mismo hueso, e incluso entre zonas de una misma parte del hueso. Además de la edad del individuo, otros factores pueden modular los procesos de crecimiento, modelado y remodelación, como por ejemplo el sexo del individuo o la actividad física (Martin *et al.*, 1998).

Aunando todas las observaciones, parece plausible pensar que, los huesos intramembranosos del cráneo presenten un plan estructural común, sin que esto signifique que tengan que presentar las mismas estructuras histológicas, o los mismos tipos de tejido, sino que se mantienen en conjunto en equilibrio, que queda reflejado a través de la similitud de las proporciones de la parte mineral, frente a la porosidad y las cavidades no mineralizadas; que podría estar coordinado por procesos de modelado, de remodelación y por el crecimiento en las suturas, siendo este un lugar en el que se observan grandes modificaciones en la organización del tejido óseo. Además en todos los huesos se han observado canales que

contactan con el exterior en la lámina externa, que podrían estar formando parte de una red vascular conjunta, localizada y dirigida a aumentar la comunicación con la región subepidérmica.

6. CONCLUSIONES

- Las láminas delgadas han permitido la correcta observación de la histología de huesos del cráneo de origen arqueológico, con diferentes técnicas de microscopía, así como la posible identificación de alteraciones tafonómicas.
- Los huesos frontal, parietal y occipital parecen mostrar unos patrones de organización similares para determinados tejidos y estructuras. En todos los cortes se observa hueso fibrolaminar en ambas tablas, un progresivo aumento de osteonas secundarias en regiones próximas a la diploe, indicando que el hueso se encuentra remodelado en estas regiones. Los espacios de reabsorción señalan que la tabla interna se encontraba en proceso de remodelado en estos huesos.
- Se ha observado hueso laminar en la región subperióstica, pero este tejido no aparece distribuido de manera uniforme en los cortes, sugiriendo que la presencia de este tejido puede estar mediada por procesos de modelado y remodelación o debido a otros factores.
- La dirección del corte parece no afectar a la interpretación de la organización histológica, ya que al observar dos cortes de hueso parietal de diferente orientación se identifican las mismas estructuras en ambos.
- Todos los huesos, sin considerar los cortes relativos a suturas, muestran canales que contactan con el exterior, dispuestos de forma seriada en la tabla externa. Estos canales podrían corresponderse con los conductos de Volkmann, que comunicarían una osteona secundaria con la región subepidérmica.
- Las suturas conforman áreas donde los huesos que se contraponen parecen mostrar altas modificaciones en los tipos de tejidos que los componen, con regiones de hueso entretejido desorganizado frente a áreas que presentan alta remodelación.
- Los huesos frontal, parietal y occipital, presentan unos porcentajes de tejido mineralizado, porosidad y de otras cavidades no mineralizadas similares entre sí, que parecen indicar que los huesos convergen hacia un patrón de organización común.

- Es necesario seguir ampliando el conocimiento de la histología del cráneo, ya que al estar las estructuras definidas en base a los huesos largos, la interpretación de los resultados está en cierta medida limitada, debido a que las fuerzas que actúan sobre estos huesos, su morfología, así como su origen, son diferentes.

7. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV/CSIC) y al Departamento de Histología por permitirme utilizar las instalaciones necesarias para llevar a cabo este proyecto. Al Dr. Fernando Barroso y al Dr. Miguel Ángel Rodríguez por su ayuda en la utilización de las diferentes técnicas de estudio.

Así mismo, quisiera dar especialmente las gracias a Carmen por ser una gran mentora, compañera y sin embargo amiga. A Marta por sus consejos, siempre sinceros y necesarios. A mis compañeros de laboratorio, Julia, Susana, Manuel y Nacho por compartir penurias y dichas. A Oscar, Armando y Josefina por llenarme la cabeza de preguntas y conocimientos y por darme la oportunidad de embarcar en este viaje al pasado. A Silvia por las sugerencias y ánimos. Y a mis amigos y sobre todo a mi familia, sin cuyo apoyo y paciencia no habría llegado tan lejos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar I. El conocimiento de las poblaciones del pasado a través de los restos óseos: Estudio del osario de la Iglesia de Santa María de la Soledad, Almansa (Albacete, S. XIII – XVIII). Creación de un catálogo digital mediante una base de datos relacional en red. [Proyecto fin de carrera]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2011.
- Bartsiokas A. Hominid cranial bone structure: a histological study of Omo 1 specimens from Ethiopia using different microscopic techniques. *The Anatomical Record* 2002; 267: 52-59.
- Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery* 2011; 30 (2): 47-53.
- de Boer HH, Aarents MJ, Maat GJR. Manual for the preparation and staining of embedded natural dry bone tissue sections for microscopy. *International Journal of Osteoarchaeology* 2011.

- Brace CL. The brain drain as a means of cooling hot heads. *Commentary/Falk: Brain evolution. Behavioral and brain sciences* 1990; 13: 333-381.
- Bromage TG, Goldman HM, McFarlin SC, Warshaw J, Boyde A, Riggs CM. Circularly Polarized Light Standards for Investigations of Collagen Fiber Orientation in Bone. *The Anatomical Record (Part B: New Anatomist)* 2003; 274B: 157-168.
- Buikstra JE, Ubelaker DH. Standards for data collection from human skeletal remains. Arkansas: Arkansas Archaeological Survey Research Series; 1994.
- Cambra-Moo O. Bioestratinomía y Fosildiagénesis de Arcosaurios. Aplicación de la Actuotafonomía al estudio de la influencia paleobiológica en el proceso tafonómico. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2006.
- Cambra-Moo O, Meneses CN, Barbero MAR., Gil OG, Pérez JR, Rello-Varona S, Martín MC, Martín AG. Mapping human long bone compartmentalization during ontogeny: a new methodological approach. *Journal of Structural Biology* 2012; 178: 338-349.
- Campillo D, Subirà ME. Antropología física para arqueólogos. Barcelona: Ariel Prehistoria; 2004.
- Carden A, Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *Journal of Biomedical Optics* 2000; 5 (3): 259-268.
- Collins MJ, Nielsen-Marsh CM, Hillier J, Smith CI, Roberts JP, Prigodich RV, Wess TJ, Csapò J, Millard AR, Turner-Walker G. The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 2002; 44 (3): 383-394.
- Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development* 1993; 117: 409-429.
- Cuijpers AG. Histological identification of bone fragments in archaeology: telling humans apart from horses and cattle. *International Journal of Osteoarchaeology* 2006; 16: 465-480.
- Currey J. Bones. Structure and mechanics. New Jersey: Princeton University Press; 2002.
- Duterloo HS, Enlow DH. A comparative study of cranial growth in *Homo* and *Macaca*. *American Journal of Anatomy* 1970; 127: 357-368.
- Enlow DH, Hans MG. Essentials of Facial Growth. W. B. United States of America: Saunders Company; 1996.
- Enlow DH. The human face: an account of the postnatal growth and development of the craniofacial skeleton. New York: Hoeber Medical Division. Harper & Row publishers; 1968.

- Falk D. Brain evolution in *Homo*: The “radiator” theory. Behavioral and brain sciences 1990; 13: 333-381.
- Frost HM. Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid manual method. Biotechnic and Histochemistry 1958; 33 (6): 273-277.
- Gilbert SF. Developmental biology. 7 ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2003.
- Hanson M, Cain CR. Examining histology to identify burned bone. Journal of Archaeological Science 2007; 34: 1902-1913.
- Hillier ML, Bell LS. Differentiating human bone from animal bone: a review of histological methods. Journal of Forensic Sciences 2007; 52 (2): 249-263.
- Jans MME, Kars H, Nielsen-Marsh CM, Smith CI, Nord AG, Arthur P, Earl N. *In situ* preservation of archaeological bone : a histological study within a multidisciplinary approach. Archaeometry 2002; 44 (3): 343-352.
- Little N, Rogers B, Flannery M. Bone formation, remodeling and healing. Surgery 2011; 29 (4): 141-145.
- Locke M. Structure of long bones in mammals. Journal of Morphology 2004; 262: 546-565.
- Lyman RL. Vertebrate taphonomy. Cambridge: Cambridge Manuals on Archaeology; 1994.
- MacKenzie WS, Adams AE. Atlas en color de rocas y minerales en lámina delgada. Barcelona: Masson; 1997.
- Martin RB, Burr DB, Sharkey NA. Skeletal tissue mechanics. New York: Springer-Verlag; 1998.
- Morriss-Kay GM. Derivation of the mammalian skull vault. Journal of Anatomy 2001; 199: 143-151.
- Morriss-Kay GM, Wilkie AOM. Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies. Journal of Anatomy 2005; 207: 637-653.
- Opperman LA. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. Developmental Dynamics 2000; 219: 472-485.
- Paine RR. How to equip a basic histological lab for the anthropological assessment of human bone and teeth. Journal of Anthropological Sciences 2007; 85: 213-219.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standarization of nomenclature, symbols, and units. Journal of Bone and Mineral Research 1987; 2 (6): 595-610.
- Pfretzschner HU. Fossilization of Harvesian bone in aquatic environments. Comptes Rendus Palevol 2004; 3 (6): 605-616.

- Kardong KV. Vertebrados: Anatomía comparada, función y evolución. 2 ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2007.
- Ross MH, Pawlina W. Histología. 5 ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2007.
- Rühli F, Kuhn G, Evison R, Müller R, Schultz M. Diagnostic value of micro-CT in comparison with histology in the qualitative assessment of historical human skull bone pathologies. *American Journal of Physical Anthropology* 2007; 133: 1099-1111.
- Scheuer L, Black S. Developmental juvenile osteology. London: Academia. Press Limited; 2000.
- Schultz M. Paleohistopathology of bone: a new approach to the study of ancient disease. *Yearbook of Physical Anthropology* 2001; 44: 106-147.
- Stout SD. Histological structure and its preservation in ancient bone. *Current Anthropology* 1978; 19 (3): 601-604.
- Turner-Walker G, Nielsen-Marsh CM, Syversen U, Kars H, Collins MJ. Sub-micron spongiform porosity is the major ultra-structural alteration occurring in archaeological bone. *International Journal of Osteoarchaeology* 2002; 12: 407-414.
- Ubelaker DH. Human skeletal remains. Washington Taraxacum; 1978.
- Ubelaker DH. Reconstruction of demographic profiles from ossuary skeletal samples. A case study from the Tidewater Potomac. Washington: Smithsonian Institution Press. (Smithsonian Contributions to Anthropology 18); 1974.
- White TD, Folkens PA. The human bone manual. 1 ed. London: Academic Press, Elsevier; 2005.